

学 位 論 文 要 旨

氏 名

堀 英夫

題 目

海産甲殻類を用いる有害物質急性毒性試験法の開発に関する研究
(Studies on development of acute toxicity testing methods of hazardous chemicals using marine crustacean species)

海洋生態系に及ぼす有害物質の影響を評価するためには、海産甲殻類を用いた急性毒性試験が必要である。しかし、急性毒性試験法は、主として淡水生物が用いられており、海産生物、特に甲殻類を用いる試験法は確立されていない。そこで、筆者は、海産甲殻類の急性毒性試験法を開発するために研究を行った。クルマエビ、アシナガモエビモドキ、スジエビモドキおよびシオダマリミジンコを選定し、試験条件を設定するとともに各種有害物質の急性毒性値を求めた。そして、それら急性毒性値、有機スズ化合物についてはクルマエビに対する生物濃縮から試験生物の適正評価を行った。稚エビを用いる試験法は、クルマエビおよびスジエビモドキにおいて脱皮によって一部の有害物質に対する感受性が変化したために、 LC_{50} を脱皮個体と未脱皮個体に区分して算出する必要があった。一方、アシナガモエビモドキは、このような感受性の変化は認められなかったが、個体間での攻撃あるいは共食いによる死亡が確認された。したがって、稚エビの試験では、1個体毎試験容器に収容する条件設定が必要であることがわかった。エビ幼生を用いる試験は、アシナガモエビモドキおよびスジエビモドキで実施され、稚エビより感受性が高いことがわかった。幼生でも個体間での攻撃あるいは共食いによる死亡が確認されたため、1個体毎試験容器に収容する条件設定が必要であった。試験期間は飢餓耐性から0日齢幼生では48時間であった。シオダマリミジンコは、ミジンコ類の方法に準じた試験が可能であるが、試験期間は飢餓耐性から24時間が限度であった。選定された試験生物は、次に示す理由から試験生物として適正であると判断された。①クルマエビは産業上重要な種であり、入手が容易であること。またTBTC1を高濃度に生物濃縮すること。②アシナガモエビモドキは有害物質に対する感受性が高く、我が国沿岸域に普通に生息する種であり、飼育が容易であること。③スジエビモドキはアジア沿岸域に普通に生息する種であり、飼育が容易であること。④シオダマリミジンコは我が国沿岸域の潮だまりに広く分布する種であり、飼育が容易で常時試験に用いることができること。したがって、これらの生物種は、沿岸域の海洋生態系における有害物質の影響評価に用いることに問題はないと考えられる。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Hideo Hori
題 目	Studies on development of acute toxicity testing methods of hazardous chemicals using marine crustacean species (海産甲殻類を用いる有害物質急性毒性試験法の開発に関する研究)

Acute toxicity test using marine crustacean species is required to evaluate exactly the impact of hazardous chemicals on marine ecosystem. Acute toxicity tests are usually executed by using the freshwater crustacean species, while the testing method using marine crustacean species has not been established. Then, author studied to develop acute toxicity testing methods using marine crustacean species. *Marsupenaeus japonicus*, *Heptacarpus futilirostris*, *Palaemon serrifer*, and *Tigriopus japonicus* were selected as a testing organism. The testing conditions for these species were studied and acute toxicity values of hazardous chemicals to those species were determined. The aptitude of these species for the acute toxicity test was evaluated by comparing the sensitivity of the selected species to the hazardous chemicals, and also was evaluated by the bioconcentration of organotin compounds in *M. japonicus*. And for the testing method using juvenile shrimp, because the acute toxicity was changed by the molting of *M. japonicus* and *P. serrifer*, it was necessary, LC_{50} in the molted individual and that in the non-molted individual were calculated separately. As for the *H. futilirostris* changes in sensitivity during the molting were not recognized, while, the attack among individuals or the death by cannibalism was confirmed. Therefore, it has been understood that it is necessary to isolate individuals in separate containers during the test to obtain accurate toxicity data. The experiment using shrimp larvae were executed by the *H. futilirostris* and the *P. serrifer*. It was obvious that the sensitivities of larvae of these species were higher than those of juveniles. Because the attack among individuals or the death by cannibalism had been confirmed in their larval stage, it was necessary that larvae of these species for acute toxicity test should be isolated into the separate test containers during the test. As zero-day-old larvae of these species survived normally for 48-h without feeding, forty-eight-hour acute toxicity testing can thus be successfully performed by using 0-day-old larvae of these species. As for *T. japonicus* nauplii, the test period was restricted for 24 hours, because *T. japonicus* nauplii cannot survive normally over 24-h without feeding. The selected testing organisms were evaluated to be proper as the testing organism for the following reasons: (1) *M. japonicus* is important species in fisheries industry, is easy to obtain, and BCF of TBTC1 to *M. japonicus* is high. (2) *H. futilirostris* usually live in littoral region of Japan, and have high sensitivity to hazardous chemicals. It is also to breed in small apparatus. (3) *P. serrifer*, breeding is easy, usually living in littoral region of Asia. (4) *T. japonicus* is living widely in the tide pool of littoral region of Japan, breeding is easy and it can be used for the test at any time. Therefore, it is thought that there is no problem in the use of these species to evaluate the influence of hazardous chemicals in marine ecosystem.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	堀 英夫		
審査委員	主査	鹿児島大学 教授	小山次朗
	副査	鹿児島大学 教授	越塩俊介
	副査	鹿児島大学 教授	板倉隆夫
	副査	鹿児島大学 准教授	安樂和彦
	副査	佐賀大学 講師	上野大介
審査協力者			
題目	海産甲殻類を用いる有害物質急性毒性試験法の開発に関する研究 Studies on development of acute toxicity testing methods of hazardous chemicals using marine crustacean species		
<p>海洋生態系に及ぼす有害物質の影響を評価するためには、海産甲殻類を用いた急性毒性試験が必要である。しかし、急性毒性試験法は、主として淡水生物が用いられており、海産生物、特に甲殻類を用いる試験法は確立されていない。そこで、筆者は、海産甲殻類の急性毒性試験法を開発するために研究を行った。クルマエビ、アシナガモエビモドキ、スジエビモドキおよびシオダマリミジンコを選定し、試験条件を設定するとともに各種有害物質の急性毒性値を求めた。そして、それら急性毒性値、有機スズ化合物についてはクルマエビに対する生物濃縮から試験生物の適正評価を行った。稚エビを用いる試験法は、クルマエビおよびスジエビモドキにおいて脱皮によって一部の有害物質に対する感受性が変化したために、LC50 を脱皮個体と未脱皮個体に区分して算出する必要があるがあった。一方、アシナガモエビモドキは、このような感受性の変化は認められなかったが、個体間での攻撃あるいは共食いによる死亡が確認された。したがって、稚エビの試験では、1 個体毎試験容器に収容する条件設定が必要であることがわかった。エビ幼生を用</p>			

いる試験は、アシナガモエビモドキおよびスジエビモドキで実施され、稚エビより感受性が高いことがわかった。幼生でも個体間での攻撃あるいは共食いによる死亡が確認されたため、1個体毎試験容器に収容する条件設定が必要であった。試験期間は飢餓耐性から0日齢幼生では48時間であった。シオダマリミジンコは、ミジンコ類の方法に準じた試験が可能であるが、試験期間は飢餓耐性から24時間が限度であった。選定された試験生物は、次に示す理由から試験生物として適正であると判断された。①クルマエビは産業上重要な種であり、入手が容易であること。またTBTC1を高濃度に生物濃縮すること。②アシナガモエビモドキは有害物質に対する感受性が高く、我が国沿岸域に普通に生息する種であり、飼育が容易であること。③スジエビモドキはアジア沿岸域に普通に生息する種であり、飼育が容易であること。④シオダマリミジンコは我が国沿岸域の潮だまりに広く分布する種であり、飼育が容易で常時試験に用いることができること。したがって、これらの生物種は、沿岸域の海洋生態系における有害物質の影響評価に用いることに問題はないと考えられる。

以上の結果、毒性試験に用いることの可能な海産甲殻類の特性を明らかにした。これらの知見は、今後の我が国の水質環境保全政策に貢献するものと考えられる。審査委員会では、本研究論文が学位論文として十分な内容であると判断した。

学力確認結果の要旨	
学位申請者 氏 名	堀 英夫
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 小山次朗
	副査 鹿児島大学 教授 越塩俊介
	副査 鹿児島大学 教授 板倉隆夫
	副査 鹿児島大学 准教授 安樂和彦
	副査 佐賀大学 講師 上野大介
審査協力者	
実施年月日	平成 2 1 年 7 月 1 3 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) (口答)・(筆答)	
<p>主査及び副査は、平成 2 1 年 7 月 1 3 日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>また、筆答により外国語（英語）の学力を確認した。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに識見を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	堀 英夫
<p>[質問 1] 今回試験に使用した有害物質の選定理由は何か。</p> <p>[回答 1] 有機スズ化合物である TBT、TPT は、使用禁止になった物質ではあるが、依然として海洋汚染物質であることから、研究の対象とした。PCP および Cr は毒性試験でしばしば基準物質として使用されており、他のデータと比較しやすい。農薬は、代表的な農薬を選定した。特に、有機リン殺虫剤である MEP の甲殻類に対する毒性が大きいことから、試験物質として選定した。</p> <p>[質問 2] MEP 以外は現在、使用禁止農薬となっているが、なぜ試験物質として選定したのか。</p> <p>[回答 2] 使用禁止農薬に関しては、過去のデータが多く比較しやすかったため、本研究で使用した。</p> <p>[質問 3] 光条件はどのように決めたのか。また、試験物質の水中濃度安定性はどうか。</p> <p>[回答 3] OECD などの一般的試験法に倣い、16 時間明、8 時間暗条件とした。水中濃度の低下に関しては有機スズ化合物及び農薬に関しては試験の最終濃度が 8 割以内に収まっている。NAC や MEP は 8 割を切る。</p> <p>[質問 4] 論文題名が試験法の開発となっているが、今回はどのようなことを明らかにしたのか。</p> <p>[回答 4] 毒性試験の基本事項は、魚類試験法をベースにした。脱皮による感受性変化など、甲殻類特有の問題を明らかにし、それをもとに試験条件を明らかにした。</p> <p>[質問 5] 本研究では複数の生物を実験に供したが、最終的に試験生物として適当であると判断するのは、どのような基準によるのか。</p> <p>[回答 5] 化学物質に対する感受性が重要であるが、その生物の分布、入手の容易さ、生態系あるいは産業上の重要性を考慮して決定する。例えば、漁場の環境保全を考えるのであれば、水産業上重要なクルマエビを試験生物として推奨する。</p> <p>[質問 6] 脱皮により感受性が変化するが、脱皮前後の時間経過でどのように変化するのか。</p> <p>[回答 6] 試験中に脱皮していたものを脱皮個体とした。特に時間経過による感受性の変化については検討していない。</p> <p>[質問 7] 有害物質はどこに蓄積するのか。</p> <p>[回答 7] 今までの既往知見によれば、物質によって蓄積部位が異なる。本研究では全身での体内濃度を分析したため、体内分布は検討していない。</p> <p>[質問 8] 脱皮による試験物質の毒性増大は、脱皮そのものにも影響を与えるのか？ 農薬では脱皮阻害をするものもあると聞くが、今回用いた試験物質はどうであったか。</p> <p>[回答 8] ご指摘のように、農薬の中には脱皮を阻害する農薬もあるが、本研究で使用した試験物質にそのような作用を有するものはなかった。</p>	